

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

BLACK BORDERS

- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-227095

(43)Date of publication of application : 10.09.1990

(51)Int.CI.

C12P 21/08  
// A61K 39/395  
C12N 5/20  
C12N 15/06  
G01N 33/53  
G01N 33/577  
(C12P 21/08  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 01-274340

(71)Applicant : OTSUKA PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 20.10.1989

(72)Inventor : OMOTO YASUKAZU

NISHIDA TSUTOMU

MIZUNO KEIKO

NAKAI SATORU

(30)Priority

Priority number : 63267897 Priority date : 24.10.1988 Priority country : JP

## (54) MONOCLONAL ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a new immunoassay capable of easily determining human TNF- $\alpha$  in high sensitivity and precision by using a monoclonal antibody having a specific reactivity to human TNF- $\alpha$ .

CONSTITUTION: A plasma cell (immunocyte) of a mammal (e.g. mouse) immunized by using human tumor necrosis factor (abbreviated as TNF) TNF- $\alpha$  as an immunogen is cultured together with a blastoma cell of a mammal (e.g. P3) in a medium such as RPMI-1640 to obtain a fused cell. A clone capable of producing the objective antibody is selected from the fused cell and is cultured to produce a monoclonal antibody. The antibody can be further purified by salting-out, gel-filtration, etc., to obtain a pure product having specific reactivity to TNF- $\alpha$ . The antibody provides an immunoassay process having extremely high sensitivity and excellent specificity and, accordingly, an extremely low concentration of human TNF- $\alpha$  such as the concentration in a clinical sample can be accurately determined by the use of the antibody.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

Abstract for AL7

## ⑫公開特許公報(A)

平2-227095

⑬Int.Cl.  
C 12 P 21/08識別記号 庁内整理番号  
8214-4B※

⑭公開 平成2年(1990)9月10日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑮発明の名称 モノクローナル抗体

⑯特 願 平1-274340

⑰出 願 平1(1989)10月20日

優先権主張 ⑱昭63(1988)10月24日 ⑲日本(JP) ⑳特願 昭63-267897

㉑発明者 大本 安一 徳島県板野郡松茂町笛木野字八下35-2

㉒発明者 西田 勉 徳島県鳴門市大津町大代240番地の118

㉓発明者 水野 啓子 徳島県徳島市中昭和町2丁目39-1 ローレルハイツ中村  
302

㉔発明者 中井 哲 徳島県板野郡松茂町広島字南川向67-4

㉕出願人 大塚製薬株式会社 東京都千代田区神田司町2丁目9番地

㉖代理人 弁理士 三枝 英二 外2名

最終頁に続く

## 明細書

発明の名称 モノクローナル抗体

## 特許請求の範囲

① ヒトTNF- $\alpha$ に特異反応性を有することを特徴とするモノクローナル抗体。

## 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、ヒトの腫瘍壞死因子(TNF : tumor necrosis factor)に対する抗体、より詳しくは医薬として有用な上記ヒトTNFの免疫学的精製、測定等を可能とする該ヒトTNFに対する抗体に関する。

従来の技術

バチルス カルメッティ ゲリーン(Bacillus de Calmette Guérin, BCG)で感作したマウス、ウサギ、ラットにリポボリサッカライド(LPS)を投与すると、血清中に腫瘍を出血性壞死させる因子が誘起される。1975年にカースウェル

(Carswell)らは、この因子をTNFと名付けた(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 72, p 3666 (1975))。BCGで感作したマウスの脾臓では、マクロファージの増生が見られ、LPSの投与によれば、その崩壊が起こることから、従来上記TNFはマクロファージにより產生されると考えられていた。最近になって、単離したマクロファージを *in vitro* LPS処理すると、その培養上清中にTNF活性が誘起されることが明らかにされ、マクロファージがTNFの產生細胞であることが確認された。また現在TNFを產生する白血病細胞が幾つか報告されている。

しかし、TNFは各種がん細胞に致死あるいは増殖抑制効果を示すが、正常細胞には之等の効果を示さないことから、がんの治療への応用の期待が高まってきており、実際にマウスあるいはウサギ由来の精製TNFを用いた割がん実験の結果から、TNFの抗腫瘍効果が認められている。

TNFの活性はこれに対して強い感受性を示すマウス由来の繊維芽細胞株L929を用いて測定されており、培養プレートに増殖させた上記L929細胞を50%崩壊致死させる濃度を1単位として、その力を表すのが一般的である。

各種動物の产生するTNFの分子量は、ゲル汎過分析で、例えばマウスでは15万と4万～6万の2種類、ウサギでは67000と39000の2種類、ヒトでは34000～140000と報告されている。SDS-PAGEによる分子量分析では、ヒト及びウサギの精製TNFは、分子量17000と報告され、現在この分子量のTNFが「TNF- $\alpha$ 」と呼ばれており、天然のTNFは多量体として存在すると考えられている。

1984年に、TNF産生細胞であるヒト前骨髄球系白血病細胞株「HL-60」を用いて、TNFのcDNAのクローニングが成功をおさめ該TNFの大腸菌での大量生産が可能となった。

すると推測されている。

TNFは、上述したようにその特有の生理活性より医薬品としての応用が期待でき、種々研究が成されていると共に、各種免疫欠損病や異常免疫応答の研究、之等の臨床サンプルにおけるその測定等の面においても種々研究が重ねられている。

しかるに、現在上記TNF- $\alpha$ の測定技術としては、バイオアッセイ（生物学的検定法）が知られており、この方法ではTNFは被検サンプルの活性量として測定されているが、この方法は操作性や精度の面で劣っており、また常に測定値を干渉する成分の存在を考慮する必要がある。従って、上記方法に代る新しいTNFの測定技術の開発が斯界で切望されている。

#### 発明が解決しようとする課題

本発明は、上記ヒトTNF- $\alpha$ の新しい免疫学的測定技術、該技術に利用できるTNF- $\alpha$ に対する抗体を提供することをその目的とする。

またこのcDNAクローニングの結果、ヒトのTNFは157個のアミノ酸より構成され、非常に長い76個のアミノ酸よりなるポリペプチドを前駆配列として持つことが明らかにされた〔D. Pearce et al., Nature, 312, 724～729 (1984)〕。ほぼ同時に、染色体上の遺伝子のクローニングも報告され〔T. Shirai et al., Nature, 313, 803 (1985)〕、ヒトのTNF遺伝子は4つのエクソンより構成されていることが明らかにされた。

TNFのアミノ酸配列及び遺伝子の塩基配列は、B細胞が产生する細胞障害性因子及びリンホトキシン（LT）とそれぞれ28%及び46%の相同意がある。但しTNFはN-グリコシル型の糖鎖の結合部位がない点で上記LTとは本質的に異なる。また、TNFとLTとは免疫学的交叉反応性を有しないが、非常に類似した細胞障害性を示すことから、両者の相同部分が該細胞障害性に関与

#### 課題を解決するための手段

本発明によれば、TNF- $\alpha$ に対して特異反応性を有するモノクローナル抗体が提供される。

本発明モノクローナル抗体の利用によれば、上記ヒトTNF- $\alpha$ を高感度、高精度でしかも簡便に測定できる新しい免疫検定法（イムノアッセイ法）が提供される。

また本発明抗体はTNF- $\alpha$ に特異的であるため、その利用によればアフィニティークロマトグラフィー等の手法によるそれらの特異的精製手段も提供できる。

以下、本発明抗体の製法につき詳述する。

本発明抗体は、TNF- $\alpha$ を免疫抗原として利用して製造することができる。より具体的には、例えば上記免疫抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）と哺乳動物の形質細胞腫細胞との融合細胞（ハイブリドーマ、hybridoma）を作成し、これより所望抗体を産生するクローンを選択

し、該クローンの培養により製造、採取することができる。

上記方法において用いられる免疫抗原としての TNF- $\alpha$ としては、特に限定ではなく、既に公知のインビトロで誘導されたヒト TNF を含有する培養上清乃至その精製標品 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 6637 (1985)]、遺伝子組換え技術に従い製造されたヒト TNF

[Nature, 312, 724~729 (1984)] 及びそれらの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等のいずれでもよい。

また、上記方法において免疫抗原で免疫される哺乳動物としては、特に制限はないが、細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般にはマウス、ラット等が有利に用いられる。

免疫は一般的な方法により、例えば上記免疫抗原を哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等

等、[J. Immunol., 123, 1548~1550 (1979)]、[J. Exp. Med., 148, 313~323 (1978)] 等や、ラットにおける R210 [Nature, 277, 131~133 (1979)] 等の骨髓腫細胞等を使用できる。

上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合反応は、公知の方法、例えばマイルスタイン (Milestein) らの方法 [Method in Immunology, Vol. 73, pp3 (1981)] 等に準じて行なうことができる。より具体的には、上記融合反応は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレンギリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等の存在下に、通常の培地内で実施され、培地には更に融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加することもできる。免疫細胞と形質細胞腫細胞との使用比は、通常の

により投与することにより実施できる。より具体的には、免疫抗原を、所望により通常のアジュvant と併用して、供試動物に 3~5 日毎に数回投与し、総投与量が約 100~500  $\mu$ g / マウス 程度になるようするが好ましい。免疫抗原としては、上記最終投与の約 3 日後に摘出した脾臓細胞を使用するのが好ましい。

更に、上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物の形質細胞腫細胞としては、既に公知の種々のもの、例えば p3 (p3 /  $\times$  63-Ag8) [Nature, 256, 495~497 (1975)]、p3-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1~7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6, 511~519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8, 405~415 (1976)]、SP2/0 [Nature, 276, 269~270 (1978)]、FO [J. Immunol. Meth.,

95, 1~21 (1980)]、 $\times$  63. 6. 5. 3. [J. Immunol., 123, 1548~1550 (1979)]、S194 [J. Exp. Med., 148, 313~323 (1978)] 等や、ラットにおける R210 [Nature, 277, 131~133 (1979)] 等の骨髓腫細胞等を使用できる。

方法と変りはなく、例えば形質細胞腫細胞に対して免疫細胞を約 1~10 倍程度用いるのが普通である。融合反応時の培地としては、形質細胞腫細胞の増殖に通常使用される各種のもの、例えば RPMI-1640 培地、MEM 培地、その他のこの種細胞培養に一般に利用されるものを例示でき、通常之等培地は牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を抜いておくのがよい。融合は上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との所定量を、上記培地内でよく混合し、予め 37°C 程度に加温した PEG 溶液、例えば平均分子量 1000~6000 程度のものを、通常培地に約 30~60% / v % の濃度で加えて混ぜ合せることにより行なわれる。以後、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰返すことにより所望のハイブリドーマが形成される。

得られる所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えば HAT 培地 (ヒポキサンチ

ン、アミノブテリン及びチミシンを含む培地)で培養することにより行なわれる。該HAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに充分な時間、通常数日~数週間行なえばよい。かくして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とする抗体の検索及び单一クローン化に供される。

目的抗体産生株の検索は、例えばELISA法(Eggall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980))、ブラーク法、スポット法、凝集反応法、オクテロニー(Ouchterlony)法、ラジオイムノアッセイ(RIA)法等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法〔「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dブランディング発行、第30-53頁、昭和57年3月5日〕に従い実施することができ、この検索には前記免疫抗原が利用できる。

かくして得られるヒトTNF- $\alpha$ を認識する所

の特異的測定に好適である。更に本発明抗体中にはTNF- $\alpha$ 分子の異なる部位を認識し、抗体相互の立体障害がなく、同時にTNF- $\alpha$ 分子に結合できるタイプの抗体も含まれ、かかる抗体は例えばサンドイッチ法等による免疫検体に有効である。更に加えて、本発明抗体中には液相系又は固相系での反応性が特に優れたタイプの抗体が含まれ、それらは液相系及び固相系免疫検定法に適用するのに適している。

#### 発明の効果

本発明によれば、ヒトTNF- $\alpha$ に特異的なモノクローナル抗体が提供され、この本発明抗体の利用によれば、測定感度が極めて高く、特異性に優れ、従って、例えば臨床サンプル等の極めて低濃度のヒトTNF- $\alpha$ を含有する検体中の、該TNF- $\alpha$ を、正確に測定可能な免疫検定法による測定手法が提供される。

#### 実施例

望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することができ、また液体窒素中で長期間保存することができる。

上記ハイブリドーマからの所望抗体の採取は、該ハイブリドーマを、常法に従って培養してその培養上清として得る方法やハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るために適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

また上記のごとくして得られる抗体は、更に塩析、ゲル汎過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の手段により精製することができる。

かくして得られる本発明のモノクローナル抗体は、TNF- $\alpha$ に特異反応性を有する。

また本発明抗体中には、ヒトTNF- $\alpha$ の生物活性に対して中和活性を有するタイプの抗体が含まれ、かかる抗体は生物活性のあるTNF- $\alpha$

以下、本発明をより詳しく説明するため実施例を挙げるが、本発明は之等に限定されない。

#### 実施例 1

##### 本発明抗体の製造

遺伝子組換え技術に従い製造したヒトTNF- $\alpha$ ([Nature, 312, 724-729 (1984)])の10~20 $\mu$ gを、BALB/cマウスに、完全フロインドアジュバントと共に腹腔内投与した。3~4週間おきに、同量を不完全アジュバントと共に2回追加投与して免疫した。最終免疫の3~4日後に、常法に準じて、細胞融合を行なった([Method in Immunology, 73, pp 3 (1981) 等参照])。即ち、該細胞融合は、上記免疫された脾細胞と骨髓腫細胞(P3U1, Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978))とを10:1の割合で用い、ポリエチレングリコール(PEG-4000)を用いて行なった。